

Réf. 10212-4 4 x 29 mL / 8 mL

BILIRUBINE DIRECTE (DBIL)

Chaque cartouche contient un volume utilisable de 29 mL de réactif R1 et 8 mL de réactif R2.

UTILISATION PRÉVUE

Le réactif DBIL EasyRA permet de mesurer la quantité de Bilirubine directe dans le sérum et le plasma humains, grâce à « l'analyseur de chimie clinique Medica EasyRA® ». Les mesures de Bilirubine permettent le diagnostic et le traitement de troubles hépatiques, hémolytiques et métaboliques, notamment l'hépatite et la lithiase biliaire.

Pour diagnostic *in vitro* uniquement. Réservé à un usage professionnel.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

La bilirubine est un pigment dérivé de l'hémoglobine. Produite par la destruction des globules rouges, elle est présente dans le sérum. Une augmentation du taux de bilirubine peut être liée à des processus hémolytiques, des affections hépatiques ou des troubles du système biliaire. Il existe deux formes de bilirubine : non conjuguée (indirecte) et conjuguée (directe). La bilirubine non conjuguée est transportée dans le foie, où elle se lie à l'albumine et se conjugue (forme directe) avec l'acide glucuronique, qui est ensuite excrété. La bilirubine indirecte n'est pas soluble dans les solutions aqueuses. L'utilisation d'alcools ou de solvants est nécessaire à sa solubilisation. Les dosages réalisés à l'aide de ce type de solvants permettent d'obtenir les taux de la bilirubine totale. Les conjugués mono- et diglucuronides de la bilirubine sont solubles dans l'eau. Ce type de dosages permet de mesurer la bilirubine directe. La méthode standard décrite par Ehrlich¹ implique la réaction de la bilirubine avec un réactif de diazotation (acide sulfanilique diazoté, par exemple) pour produire un composé coloré, l'azobilirubine. Cette analyse permet de mesurer la bilirubine directe (conjuguée) en fonction de son association (conjugaison) avec un sel de diazonium en présence d'un acide sulfamique pour former l'azobilirubine.

PRINCIPE DE LA PROCÉDURE

Le point final de cette réaction est basé sur l'utilisation de sel de 2,4-dichlorophényl-diazonium comme réactif de diazotation :

Bilirubine directe +2,4-dichlorophényl-diazonium → Sel d'azobilirubine

La bilirubine directe (conjuguée) se lie au réactif de diazotation pour former l'azobilirubine. L'augmentation de l'absorbance, mesurée à 550 nm, est proportionnelle à la concentration en bilirubine directe.

RÉACTIFS

Réactif DBIL (R1) :

EDTA-Na ₂	0,1 mmol/L
NaCl	154 mmol/L
Acide sulfamique	100 mmol/L

Réactif DBIL (R2) :

Sel de 2,4-dichlorophényl-diazonium	5 mmol/L
HCL	0,9 mol/L
EDTA-Na ₂	0,13 mmol/L

Précautions

1. Les bonnes pratiques de sécurité en laboratoire doivent être respectées lors de la manipulation des réactifs de laboratoire. (CLSI, GP17-A2).
2. NE PAS inhaler ni ingérer, et éviter tout contact avec la peau et les yeux. En cas de contact avec les yeux, rincer abondamment avec de l'eau et consulter un médecin. En cas de contact avec la peau, rincer immédiatement avec de l'eau pendant 10 minutes. En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin. Consulter la fiche de données de sécurité pour obtenir des informations sur les risques, les dangers et la sécurité.
3. Comme pour toute procédure de test diagnostique, l'interprétation des résultats doit tenir compte des résultats de tous les autres tests ainsi que de l'état clinique du patient.
4. Utiliser uniquement des cuvettes à usage unique.

INSTRUCTIONS CONCERNANT LA MANIPULATION, LE STOCKAGE ET LA STABILITÉ DU RÉACTIF

Le réactif est fourni prêt à l'emploi. Le réactif non ouvert est stable jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette, à condition d'être stocké entre 2 et 8 °C. Le réactif ouvert, conservé à bord de l'analyseur EasyRA dans le compartiment réfrigéré du réactif, est stable pendant le nombre de jours programmés dans la puce RFID sur la cartouche de réactif. Ne pas utiliser le réactif s'il est trouble ou nuageux, ou s'il ne parvient pas à retrouver les valeurs de contrôle sérique connues.

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS, STOCKAGE / STABILITÉ

Utiliser du sérum ou du plasma clair non hémolysé. Protéger les échantillons de la lumière directe du soleil ou des sources de lumière artificielle car la bilirubine (non conjuguée) est instable.² Le dosage doit être effectué dans les 2 heures qui suivent le prélèvement car la bilirubine est instable dans l'échantillon. Si le dosage de ces échantillons ne peut être effectué dans cet intervalle de temps, conserver jusqu'à 3 jours entre 2 et 8 °C.³ Les échantillons peuvent aussi être conservés pendant 3 mois à -70 °C. Des tubes enduits d'héparine de lithium peuvent être utilisés pour le prélèvement du plasma.

PROCÉDURE

Matériel fourni

Cartouche de réactif Medica DBIL, Réf. 10212

Matériel auxiliaire nécessaire

Medica EasyCal – Chimie, Réf. 10651

Medica EasyQC®, Niveau A – Chimie/Électrolytes, Réf. 10793

Medica EasyQC, Niveau B – Chimie/Électrolytes, Réf. 10794

Cartouche de colorant pour test de précision Medica, Réf. 10764

Cartouche de nettoyant Medica – Chimie et électrodes sélectives, Réf. 10660 *ou*

Cartouche de nettoyant Medica – Chimie, Réf. 10661

Mode d'emploi

Le réactif est fourni prêt à l'emploi. Retirer le bouchon et placer le réactif dans le plateau de l'analyseur EasyRA, situé dans le compartiment approprié de la cartouche. Une fois ouvert, le réactif est stable s'il se trouve dans le compartiment réfrigéré de l'analyseur EasyRA pendant le nombre de jours programmés dans la puce RFID sur la cartouche du réactif (30 jours maximum), ou s'il est retiré et conservé réfrigéré à une température comprise entre 2° et 8° C (bouché) après l'ouverture.

Remarque : Vérifier l'absence de mousse au niveau des collets de la cartouche après avoir retiré les bouchons et placé la cartouche sur l'analyseur EasyRA. S'il y a de la mousse, procéder à son élimination à l'aide d'un écouvillon ou d'une pipette jetable avant d'effectuer le test. Utiliser des écouvillons ou pipettes jetables différents pour R1 et R2.

Étalonnage

Medica EasyCal - Chimie (Réf. 10651) est recommandé pour étalonner le dosage. L'intervalle d'étalonnage (30 jours maximum) est programmé dans la puce RFID sur la cartouche de réactif. Un nouvel étalonnage doit être effectué à chaque changement de numéro de lot de réactifs ou en cas d'écart entre les valeurs du contrôle de qualité.

Contrôle de qualité

Il est recommandé d'inclure deux niveaux de contrôle (normal et anormal) à base de sérum humain quotidiennement lors des tests patient et à chaque changement de numéro de lot de réactifs. Si les résultats du matériel de contrôle du dosage ne correspondent pas à l'intervalle de valeurs attendues, cela peut indiquer la présence d'une dégradation du réactif, d'un mauvais fonctionnement de l'instrument ou d'erreurs survenues au cours de la procédure. Le laboratoire doit respecter les réglementations locales, d'état et fédérales en matière de contrôle de qualité, lorsqu'il en utilise le matériel.

Résultats

Une fois le dosage terminé, l'analyseur EasyRA calcule la concentration en bilirubine directe à partir du rapport entre l'absorbance corrigée de l'échantillon (soit l'absorbance de blanc du réactif moins l'absorbance du blanc de l'échantillon) et l'absorbance corrigée de l'étalon (soit l'absorbance de blanc du réactif moins l'absorbance du blanc de l'échantillon), multiplié par la concentration de l'étalon.

$$\text{DBIL (mg/dL)} = \frac{[(A_{U_{550}} - A_{U_{700}}) - (A_{RBIK_{550}} - A_{RBIK_{700}})] - [(A_{U_{550}} - A_{U_{700}})_{SBIK} - (A_{RBIK_{550}} - A_{RBIK_{700}})_{SBIK}] \times dF}{[(A_{C_{550}} - A_{C_{700}}) - (A_{RBIK_{550}} - A_{RBIK_{700}})] - [(A_{C_{550}} - A_{C_{700}})_{SBIK} - (A_{RBIK_{550}} - A_{RBIK_{700}})_{SBIK}] \times dF} \times \text{CalValue}$$

Où A_U représente l'absorbance de l'inconnu. A_{RBIK} correspond à l'absorbance du blanc du réactif associé à l'échantillon à déterminer, et $SBIK$ à l'absorbance du blanc de l'échantillon associé à l'échantillon à déterminer. Les taux d'absorbance comportant la lettre C en indice sont associés à l'étalon. La réaction étant modifiée avec l'ajout, dans un deuxième temps, du réactif R2, un facteur de correction de dilution (dF) est intégré au calcul.

Valeurs attendues³

L'intervalle des valeurs de référence pour la bilirubine directe présente dans le sérum est le suivant :

Adulte : de 0,0 à 0,20 mg/dL (0,0 à 3,4 µmol/L)

Ces valeurs sont fournies à titre indicatif. Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir son propre intervalle de valeurs attendues, compte tenu des différences qui existent entre les instruments, les laboratoires et les populations locales.

Limites de la procédure (si les valeurs de l'échantillon sont au-dessus de la limite supérieure de l'intervalle, par exemple)

Utiliser uniquement des échantillons de sérum ou de plasma non hémolysé. Ce dosage n'a pas été testé sur les nouveau-nés.

L'analyseur chimique Medica EasyRA signale tout résultat supérieur à 10 mg/dL en Haute Linéarité « HL ». Si l'icône de « répétition » est sélectionnée par l'opérateur, l'échantillon peut être à nouveau testé avec la moitié (1/2) de son volume. Le calcul des résultats issus de la répétition du test prend en compte la diminution de la taille de l'échantillon. Cela aura pour conséquence d'allonger l'intervalle rapporté du dosage de la bilirubine jusqu'à 20 mg/dL.

CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES⁴

Intervalle rapporté

L'intervalle rapporté est compris entre 0,06 et 10 mg/dL. Il est compris entre 0,06 et 20 mg/dL lorsque la moitié de l'échantillon est utilisée (dilution à 1:1).

Inexactitude/corrélation (CLSI, EP9-A2)

Le tableau suivant regroupe les données obtenues lors d'une comparaison de la performance entre le réactif Bilirubine directe Medica (y) avec l'analyseur EasyRA utilisant une longueur d'onde principale de 550 nm et une longueur d'onde secondaire de 700 nm et le même réactif Bilirubine directe (x) avec l'analyseur EasyRA utilisant uniquement une longueur d'onde primaire de 550 nm. Les données fournies ci-dessous correspondent à des dosages uniques obtenus sur l'analyseur EasyRA par rapport à la moyenne des valeurs d'échantillons déterminés en double sur l'analyseur chimique EasyRA.

Nombre d'échantillons	53	Intervalle des échantillons	0,06 à 9,50 mg/dL
Pente	1,0376	Ordonnée à l'origine	-0,0456
Coefficient de corrélation	0,9986	Équation de régression	$Y = 1,0376 * X - 0,0456$

Le tableau suivant regroupe les données obtenues en comparant des échantillons équivalents de sérum (x) et de plasma (y) à l'aide du réactif Medica DBIL sur l'analyseur EasyRA. Les données ci-dessous comparent un dosage unique du plasma par rapport à la moyenne des valeurs d'échantillons de sérum déterminées en double.

Nombre d'échantillons	52	Intervalle des échantillons	0,07 à 9,95 mg/dL
Pente	1,0064	Ordonnée à l'origine	0,01
Coefficient de corrélation	0,9992	Équation de régression	$Y = 1,0064 * X - 0,01$

Imprécision (CLSI, EP5-A2)

Des mesures doubles de chacun des trois niveaux du matériel de contrôle de qualité ont été testées deux fois par jour pendant 20 jours. La précision intra-série et la précision totale ont été déterminées à partir de ces données.

Imprécision intra-série :

Taux du CQ mg/dL	DS intra-série mg/dL	CV intra-série %
2,47	0,04	1,59
1,31	0,02	1,83
0,20	0,01	5,49

Imprécision totale :

Taux du CQ mg/dL	DS imprécision totale mg/dL	CV imprécision totale %
2,47	0,05	2,09
1,31	0,02	1,87
0,20	0,01	6,93

Linéarité (CLSI, EP6-A)

Linéarité comprise entre 0,06 et 10 mg/dL, en fonction de la régression linéaire $Y = 0,98 * X + 0,0365$.

Limite du blanc (LdB) :	0,04 mg/dL	(CLSI, EP17-A)
Limite de détection (LD) :	0,06 mg/dL	(CLSI, EP17-A)
Limite de quantification (LQ) :	0,05 mg/dL	(CLSI, EP17-A)

Substances interférentes (CLSI, EP7-A)

Une interférence inférieure à 10 % est désignée par « aucune d'interférence significative ».

Il existe une interférence négative significative liée à l'hémoglobine. Utiliser **uniquement** des échantillons de sérum ou de plasma non hémolysé.

Pour une DBIL de 2,55 mg/dL, aucune interférence significative n'a été observée à un taux de triglycérides allant jusqu'à 460 mg/dL (à l'aide du produit Intralipid*). Medica déconseille d'utiliser des échantillons visiblement troubles. Il y a une interférence positive significative du vert d'indocyanine. Des échantillons contenant des niveaux élevés d'immunoglobuline M (IgM) ou des échantillons de patients atteints de macroglobulinémie de Waldenström peuvent produire des résultats peu fiables.

*Intralipid est une marque déposée de Pharmacia AB à Clayton, Caroline du Nord.

Young fournit une liste de médicaments et autres substances qui interfèrent avec les tests cliniques chimiques.^{5,6}

RÉFÉRENCES

1. Ehrlich, P., *Sulfadiazobenzol, ein Reagens auf Bilirubin*. Centr. Klin. Med. 4; 721-723 (1883).
2. Gordon, E.R., *The Conjugate of Bilirubin*. *Hepatology* (NY) 2: 19 (1975)
3. Burtis, C.A. and Ashwood, E.R. (Eds), *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd edition, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1994).
4. Documentation de Medica.
5. Young DS. *Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests* 4th ed. Washington, DC: AACC Press; 1995.
6. Young DS. *Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests*. 2nd ed. Washington, DC. AACC Press; 1997.

Paramètres du dosage (DBIL) EasyRA

Longueur d'onde principale (nm)	550
Longueur d'onde secondaire (nm)	700
Mode réactionnel	Point final (2)
Sens réactionnel	Croissant
Blanc du réactif	Oui (à chaque étalonnage)
Blanc de l'échantillon	Oui
Durée de la réaction	4,5 min
Intervalle d'étalonnage (maximum)	28 jours
Stabilité du réactif à bord	30 jours

Sérum / Plasma

Volume de l'échantillon (µl)	10,0
Volume du diluant 1 (µl)	10
Volume du diluant 2 (µl)	10
Volume du réactif R1 (µl)	160
Volume du réactif R2 (µl)	40
Emplacements décimaux (par défaut)	2
Unités (valeurs par défaut)	mg/dL
Facteur de dilution	1:1 (pour augmenter l'intervalle de dosage)
Linéarité	0,06 à 10 mg/dL